

酱油发酵过程中细菌群落结构的动态变化

耿予欢¹, 谢显华², 李国基¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东省轻纺建筑设计院, 广东广州 510080)

摘要: 本文采用 16S rDNA PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳) 指纹图谱和系统发育分析方法, 以高盐稀醪发酵工艺生产的广东酱油为研究对象, 揭示了酱油生产发酵过程中细菌群落结构的多样性及动态变化。从样品中提取总细菌 DNA, 用降落 PCR 扩增 16S rDNA V3 片段序列, 再通过分析 DGGE 图谱选择特异性条带, 进行割胶回收、测序及 Blast 分析。DGGE 图谱表明, 发酵初期样品具有丰富的微生物群落, 但之后只有少数种类细菌存活, 整个酱油发酵过程微生物群落结构的演变规律是由复杂到简单, 这也说明酱油发酵环境具有抑制微生物生长的作用。测序结果表明, 代表最相似菌为魏斯菌属 (*Weissella cibaria*) 和非培养的肠杆菌属 (*Uncultured Enterobacter sp.*), 其次是嗜盐四联球菌 (*Tetragenococcus halophilus*)、类肠膜魏斯氏菌 (*Weissella paramesenteroides*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter sp. BFI-8*)。

关键词: 酱油; 发酵; 细菌; 动态变化

文章编号: 1673-9078(2015)8-83-87

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.015

Dynamic Changes in Bacterial Community Structure During Soy Sauce Fermentation

GENG Yu-huan¹, XIE Xian-hua², LI Guo-ji¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Light-textile Architecture Design Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Techniques such as 16S rDNA polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) fingerprinting and phylogenetic analysis were used to reveal the dynamic changes in bacterial community structure during a high-salt-diluted fermentation of guangdong soy sauce. Total bacterial DNA was extracted from the samples and touchdown PCR was performed to amplify the V3 region of 16S rDNA. Subsequently, based on DGGE fingerprints, the specific gel bands were excised, sequenced, and analyzed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The DGGE fingerprints showed that various types of bacterial communities existed in the initial fermentation period, but only few survived in the later stages. The evolutionary pattern of the microbial community structure during soy sauce fermentation progressed from complex to simple, which demonstrated that the growth of microorganisms was inhibited by the conditions of fermentation. The sequencing identified the bacterial strains as *Weissella cibaria* and uncultured *Enterobacter sp.* with highest similarity, followed by *Tetragenococcus halophilus*, *Weissella paramesenteroides*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, and *Enterobacter sp. BFI-8*.

Key words: soy sauce; fermentation; bacteria; dynamic changes

酱油是我国传统的酿造调味品, 历史悠久, 其生产工艺大致可以分为低盐固态发酵和高盐稀态发酵。一般酱油生产需经过原料处理、制曲、发酵、浸出酱油及加热灭菌等流程, 而且已经实现了纯种制曲发酵, 但由于其生产环境的开放性, 使得酱油的产生也是多种微生物协同作用的结果。因此, 酱油中种类繁多的呈味、生香和营养物质的出现与这些微生物的一系列

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B020316004)

作者简介: 耿予欢 (1973-), 女, 博士, 高级工程师, 从事食品发酵工程研究工作

通讯作者: 李国基 (1955-), 男, 高级工程师

生化反应有直接的关系。由此可见, 了解酱油发酵生产过程中微生物菌落结构有利于控制微生物的生长繁殖, 保证产品的质量及风味^[1~3]。

然而, 运用传统微生物研究方法对准确了解微生物的多样性还存在很多困难, 因为微生物种属之间的显性特征往往因环境差异而出现交叉表象^[4]。但现代分子生物学技术以核酸分子 (DNA 或 RNA) 为研究对象, 可在无需纯培养的情况下, 对样品中的微生物直接进行研究, 从技术上克服了传统培养法的缺陷, 能更全面、客观地对样品进行分析, 更精确地揭示微生物种类和遗传多样性等。自 Muyzer^[5]等首次将 PCR-DGGE 技术用于研究微生物多样性以来, 该技术

已经被广泛应用于各种环境的微生物多样性研究。

目前,国内外对酱油生产的研究主要集中在微生物鉴定、菌种、工艺、设备、新产品开发等方面。但是,未见应用分子生物技术研究酱油发酵过程中微生物群落结构变化的相关报告。本试验采用 PCR-DGGE 技术研究酱油发酵生产过程中的主要微生物,揭示它们在高盐条件下的动态变化,从而为后续的工艺调整、产品风味、产品质量安全等方面提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 样品

试验样品采自某酱油厂的某发酵缸,由于酱油生产的发酵周期为3个月,因此,共7个采样时间,分别为:发酵0、15、30、45、60、75及90 d(2个重复)。采样位置为发酵缸的中上层和顶层。

1.1.2 主要试剂和仪器

Biometra Tgradient PCR 仪, Biometra, 德国; Biorad DCode Apparatus DGGE 电泳仪, Biorad, 美国; GelDoc 2000 System 凝胶成像仪, Biorad, 美国; 酱油类 DNA 提取试剂盒, 北京鼎国生物技术有限责任公司, 北京; 40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液(37.5:1), 北京普博欣生物科技有限责任公司, 北京。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

无菌条件下取样品 10 g(2个重复),加入 50 mL 灭菌水,摇床振荡 60 min。4 °C 4000 g 离心 15 min,取上清于 4 °C 5000 g 离心 10 min,取上清,于 4 °C 保存。参照酱油类 DNA 提取试剂盒说明提取预处理过的样品,所提取的 DNA 溶于 TE 缓冲液,-20 °C 条件下保存。

1.2.2 PCR-DGGE 引物序列

参照文献^[6]设计引物 16S rDNA V3 片段,引物由上海生物工程有限公司合成,序列如下:

338F-GC-clamp: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGC
GGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGC

TACGGGAGGCAGCAG-3'

518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

1.2.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

50 μL 的 PCR 反应体系如下:25 μL 的 Premix Taq (TaKaRa 公司),模板 DNA 5 μL,正反引物(20 μM)各 1 μL 和适量的灭菌双蒸水补足 50 μL。

PCR 反应采用 touchdown 降落 PCR^[7],即:预变

性条件为 94 °C 5 min,前 20 个循环为 94 °C 1 min,65~55 °C 1min(每个循环后退火温度下降 0.5 °C)和 72 °C 1 min;再于恒定退火温度下进行 10 个循环(94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min),最后再 72 °C 延伸 10 min,于 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳检查后于 4 °C 保存备用。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及图谱分析

DGGE 采用 Biorad DCode Apparatus DGGE 电泳仪,8%聚丙烯酰胺凝胶电泳。变性梯度范围 15%~55%(100%变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺),在 1×TAE 缓冲液中 200 V 电泳 240 min。经 SYBR Green I(Invitrogen 公司)染色后用凝胶成像系统照相。图像用 Quantity One 分析软件进行分析。

1.2.5 DNA 的回收测序

无菌条件下切下 DGGE 胶上的特征条带,置于 40 μL 无菌双蒸水中 4 °C 过夜。取 2 μL 模板 DNA 进行 PCR 扩增(条件同上)。PCR 产物经 DGGE 证明于所割条带迁移位置相同时,再割胶回收,用不含 GC 夹子的引物再次扩增,扩增产物经纯化及琼脂糖凝胶电泳检验后用于测序。登陆 NCBI,将所得序列与 GenBank 数据库中已知序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA V3 片段的扩增

采用试剂盒提取的基因组 DNA 为模板(无需纯化),采用大多数细菌和古细菌的 16S rDNA V3 片段的特异性引物 338F-GC 和 518R 进行扩增,由于所设计引物扩增的目的长度应为 230 bp 左右,由图 1 可见,PCR 产物效果理想,并且无拖尾现象及引物二聚体出现,与 Marker 条带对比,可知产物浓度能够满足 DGGE 电泳的加样要求。

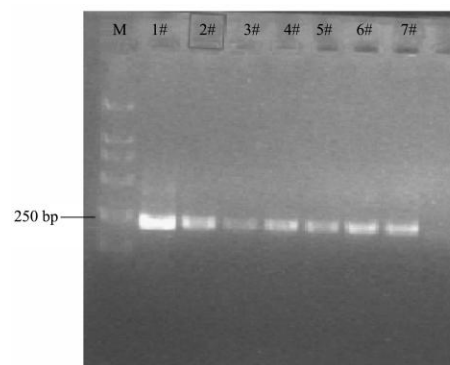


图 1 16S rDNA 目标片段 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Result of 16S rDNA PCR amplification of total DNA

注: M: DL2000Marker; 1#: 成曲; 2#: 发酵 15 d; 3#:

发酵 30 d; 4#: 发酵 45 d; 5#: 发酵 60 d; 6#: 发酵 75 d; 7#: 发酵 90 d.

2.2 细菌 DNA 的 DGGE 图谱及图谱分析

不同发酵时间所提取的基因组 DNA 经变性梯度凝胶电泳后的 DGGE 图谱, 如图 2 所示。由图 2 可知, 成曲(发酵 0 d)表现的细菌多样性最复杂, 这与细菌的生长环境有关, 发酵 15 d 到发酵 90 d 的样品的细菌多样性明显少于成曲。比较同一迁移位置的条带, 发现有的条带从成曲到发酵期结束显现的菌群优势一直很明显, 有的条带进入发酵期后明显较暗, 有的条带甚至逐渐消失, 这是由于发酵期间, 微生物处于高盐生长环境, 而且随着发酵时间的增长, 暴晒时间也就越长, 从而使发酵缸内处于高温状态, 大多数菌不适应此类生长条件而死亡, 由此可见酱油生产的发酵条件具有抑制微生物生长的作用。

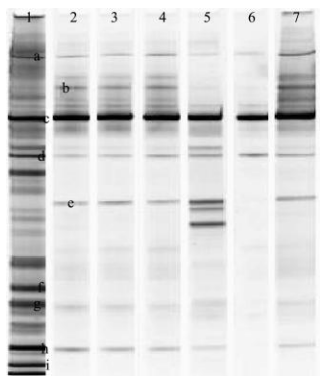


图 2 不同发酵时间样品细菌总 DNA 的 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE fingerprint of total bacterial DNA at different time points during the fermentation

注: 1#: 成曲; 2#: 发酵 15 d; 3#: 发酵 30 d; 4#: 发酵 45 d; 5#: 发酵 60 d; 6#: 发酵 75 d; 7#: 发酵 90 d.

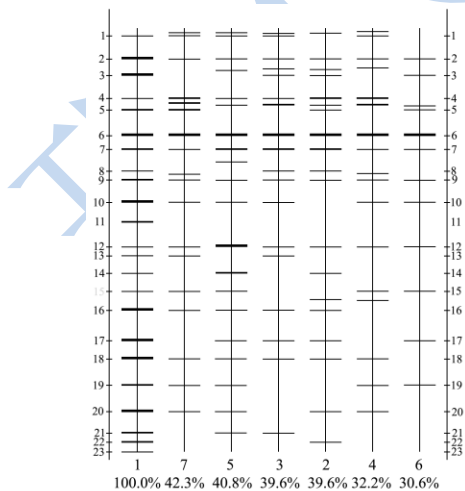


图 3 泳道/条带识别图

Fig.3 Comparison of lanes obtained in DGGE

利用 Quantity One 软件对不同发酵时间样品细菌

总 DNA 的 DGGE 图谱进行分析, 结果如图 3 所示。泳道中的条带粗细不一, 对应其在 DGGE 胶上的密度大小不同。密度大, 条带比较粗黑; 密度小, 条带比较细。图中显示共 23 类条带, 其中如 2 号、3 号、6 号、10 号、12 号、16 号、17 号、18 号、19 号、20 号、21 号等均显示为优势条带, 同时, 如 11 号等被视为特征条带, 这些条带都会进行割胶回收分析。

根据条带的比对结果, 可以根据戴斯系数 Cs (Dice coefficient) 计算出各样品相似性的矩阵图, 如图 4 所示。最大相似度为 75.7%, 最小相似度为 30.6%。相似度超过 60% 的两两比对有 12 组, 分别是 2 号和 3 号、2 号和 4 号、2 号和 5 号、2 号和 6 号、2 号和 7 号、3 号和 4 号、3 号和 5 号、3 号和 6 号、3 号和 7 号、4 号和 5 号、4 号和 7 号、5 号和 7 号, 说明它们之间的菌落结构相似程度比较高, 同时也说明发酵期间的菌群结构相似性较大。

Lane	1	2	3	4	5	6	7
1	100.0	39.6	39.6	32.2	40.8	30.6	42.3
2	39.6	100.0	79.2	73.4	62.2	61.1	68.8
3	39.6	79.2	100.0	74.3	64.7	63.0	67.0
4	32.2	73.4	74.3	100.0	63.4	59.4	75.7
5	40.8	62.2	64.7	63.4	100.0	55.5	62.2
6	30.6	61.1	63.0	59.4	55.5	100.0	58.3
7	42.3	68.8	67.0	75.7	62.2	58.3	100.0

图 4 相似性矩阵图

Fig.4 Similarity matrix of DGGE patterns

根据电泳条带的数量, 质量及迁移率进行聚类分析。由图 5 可知, 成曲的微生物与发酵期间的微生物相似性较低, 而到发酵 45 d 后, 5 号、6 号和 7 号样品的微生物相似性高达 90% 以上, 这说明在发酵后期, 发酵缸内的微生物群落变化不大, 而成曲样品的多数微生物进入发酵罐后由于环境的盐分过高生长受抑制而死亡。

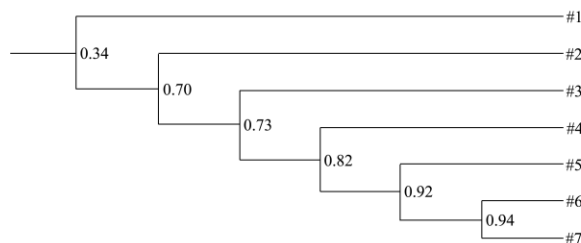


图 5 不同发酵时期微生物种群多样性聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of microbial diversity at different time points during the fermentation

注: 1#: 成曲; 2#: 发酵 15 d; 3#: 发酵 30 d; 4#: 发酵 45 d; 5#: 发酵 60 d; 6#: 发酵 75 d; 7#: 发酵 90 d.

2.3 测序结果及分析

本文对DGGE图谱上分离的条带选择了9条特异性条带(图2标示)进行割胶、扩增、纯化、测序,在NCBI上用BLAST软件在GenBank中与参考序列进行相似性比对,分析结果如表1所示,细菌相似性均达95%以上。

表1 DGGE 特异性条带序列分析结果

Table 1 DGGE analysis results of specific band sequences

条带号	亲缘关系最相似菌株	相似性/%	登录号
a	Weissella cibaria	99	GU138616.1
b	Weissella cibaria	100	GU138616.1
c	Weissella cibaria	100	GU138616.1
d	Weissella paramesenteroides	98	GU369786.1
e	Tetragenococcus halophilus	99	AB045395.1
f	Uncultured Enterobacter sp.	100	GQ999789.1
g	Citrobacter freundii	98	GU003822.1
h	Enterobacter sp. BF1-8	95	GQ861528.1
i	Enterobacter aerogenes	97	EU982884.1

本文选取了部分特异性条件进行种属分析,但结合图2及表1分析,仍可表明:微生物在酱油发酵生产期间具有显著的差异性 & 动态演替过程。在成曲时期微生物具有较高的多样性, *Weissella cibaria* (魏斯菌属), *Weissella paramesenteroides* (类肠膜魏斯氏菌), *Uncultured Enterobacter sp* (非培养的肠杆菌属), *Citrobacter freundii* (弗氏柠檬酸杆菌), *Enterobacter sp. BF1-8* (肠杆菌属), *Enterobacter aerogenes* (产气肠杆菌) 均被检出,这证明了 DGGE 技术用于分析微生物多样性方面的优越性。a、b、c 三条带均检出为 *Weissella cibaria* (魏斯菌属),这可能是由于该菌种的含量主导优势过大,而且存在于整个发酵周期,而造成电泳过程产生的部分拖尾现象,赵镇国^[9]等从泡菜种提取营养乳酸菌的研究中也分离出了 *Weissella cibaria* (魏斯菌属)。d、h和g条带分别为 *Weissella paramesenteroides* (类肠膜魏斯氏菌), *Enterobacter sp. BF1-8* (肠杆菌属) 和 *Citrobacter freundii* (弗氏柠檬酸杆菌),它们的数量随发酵时间的增长而有逐渐减少的趋势,这说明发酵环境能抑制这类菌的生长,但正是因为有它们的存在才能产生各种生香物质。f 和 i 条带分别为 *Uncultured Enterobacter sp.* (非培养的肠杆菌属) 及 *Enterobacter aerogenes* (产气肠杆菌),它们只存在成曲时期,进入发酵期就消失了,或者菌落很少以致试验无法获得足够的基因组 DNA 而在图谱中显现,这说明此类菌种不适应高盐的生长环境。成曲样品并未检出 e 条带 *Tetragenococcus halophilus* (嗜盐四联球菌),但进入发酵期后此菌种的主导优势逐渐显现。嗜盐四联球菌是一种耐高盐的菌,广泛存在于盐渍产品,

如凤尾鱼腌渍品^[10]、酱油等,罗立新^[11]等从采用传统露天酿造工艺的中国酱油发酵酱醪中分离筛选了嗜盐四联球菌。由 DGGE 图谱及测序结果表明,酱油中种类繁多的呈味、生香和营养物质的出现与这些微生物的存在及它们的一系列生化反应有直接的关系。

3 结论

3.1 本文采用 16S rDNA 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 指纹图谱和系统发育分析方法,揭示了酱油生产发酵过程中细菌群落结构的动态变化。从样品中提取总细菌 DNA,用降落 PCR 扩增 16S rDNA V3 片段序列,再通过分析 DGGE 图谱选择特异性条带,进行割胶回收、测序及 Blast 分析。DGGE 图谱表明,发酵初期样品具有丰富的微生物群落,但之后只有少数种类细菌存活,这说明酱油发酵环境具有抑制微生物生长的作用。测序结果表明,代表最相似菌为魏斯菌属 (*Weissella cibaria*) 和非培养的肠杆菌属 (*Uncultured Enterobacter sp.*),其次是嗜盐四联球菌 (*Tetragenococcus halophilus*)、类肠膜魏斯氏菌 (*Weissella paramesenteroides*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter sp. BF1-8*)。

3.2 DGGE 图谱及试验结果表明,PCR-DGGE 技术能够有效、直观地反映酱油生产发酵过程中细菌群落结构的动态变化。利用 DGGE 分离 16S rDNA 的 PCR 产物,从梯度凝胶 DNA 条带的数量、条带中 DNA 浓度及条带的分布来分析细菌的群落特征,是一种快速研究微生物群落的方法。采用降落 PCR 能确保 PCR 产物具有更高的特异性,减少优先扩增和异源双链的形成,从而使 DGGE 图谱更清晰提高分离效果。

参考文献

- [1] 施庆珊,陈仪本,欧阳友生,等.酱油酿造中的生香酵母及生香过程[J].中国酿造,2006,154(1):57-60
SHI Qing-shan, CHEN Yi-ben, OU YANG You-sheng, et al. Flavor development resulted in the derivation of yeasts in soy sauce brewing [J]. China Brewing, 2006, 154(1): 57-60
- [2] 白凤翎,赵丽红.酱油的国家卫生微生物标准探析与建议[J].食品研究与开发,2006,27(3):194-196
BAI Feng-ling, ZHAO Li-hong. Analysis and proposals national hygiene microbiological criteria for soy sauce [J]. 2006, 27(3): 194-196
- [3] 李金红.改进酱油酿造工艺提高风味[J].江苏调味副产品,2006,23(3):22-23

- LI Jin-hong. The improvement of fermenting technology for better soy sauce [J]. *Jiangsu Condiment and Subsidiary Food*, 2006, 23(3): 22-23
- [4] Holley R A. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meats [J]. *Food Microbial*, 1997, 14: 201-211
- [5] Muyzer G, Wall DE. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16SrRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700
- [6] Elisabette G, Sara L, Lisa S, et al. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened parmigiano reggiano cheese [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(3): 347-351
- [7] Ampe F, ben OmarN, Moizan C, et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations [J]. *Appl. Environ. Microbial.*, 1999, 65: 5464-5473
- [8] 赵镇国,权伍荣,李官浩,等.泡菜的分离菌株及其在半风干香肠中的应用[J].*食品科技*,2008,5:11-13
ZHAO Zhen-guo, QUAN Wu-rong, LI Guan-hao, et al. The isolated strains from kimchi and its use in semi-dry fermented sausage [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 5: 11-13
- [9] MarcebV,Aida P de Rui Holgado, Jorge J Sanchez, et al. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(3): 664-666
- [10] 罗立新,吕莉,潘力,等.中国酱油发酵酱醪中嗜盐四联球菌的鉴定[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*,2006, 12(34):20-24
LUO Li-xin, LV Li, PAN Li, et al. Identification of *Tetragenococcus halophilus* Isolated from Chinese soy sauce koji [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2006, 12(34): 20-24